

Forekomst av MMP-2 i Orale Skvamøse Cancer Celler

Kristin Jacobsen og Marit Næss
Institutt for Oral Biologi, Universitetet i Oslo

INTRODUKSJON

Munnhulekreft (fremre to tredeler av tunge, munnhulens gulv, harde gane, gingiva og kinnslimhinne) rammer ca. 250 personer årlig i Norge. Forekomsten øker, og selv om sykdommen tilsynelatende rammer flest eldre, ser man også en bemerkelsesverdig økning blant yngre aldersgrupper.¹

Plateepitelkarsinomer utgjør langt de fleste tilfellene av kreft i munnhulen (90%), og må sies å være en aggressiv kreftform med en 3-årsoverlevelse i ca. 50 % av tilfellene. Til tross for omfattende forskning for å forbedre behandlingen av disse pasientene er 5-årsoverlevelsesraten ikke vesentlig bedret de siste 50 årene.²

En stor del av plateepitelcarcinomene i munnhulen er forutgått av relativt lett synlige hvite eller røde flekker i munnslimhinnen, noe som åpner for muligheten til å identifisere og behandle lesjonene på et tidlig stadium. 5-15 % av leukoplakiene og opptil 90 % av erytroplakiene vil utvikles til kreft. Det er derfor grunn til å være oppmerksom på malignitetspotensialet til disse lesjonene.^{3, 4, 5, 6} Metodene som har vært tilgjengelige for å identifisere og vurdere malignitetspotensialet på lesjonene er basert på lokalisasjon, TNM-gradering og den histologiske diagnosen. Problemet med metodene har vært at de ikke forutsier det kliniske forløpet med tilfredsstillende sikkerhet. Det viser seg nemlig at en rekke orale svulster viser et uforutsigbart klinisk forløp slik at både over- og underbehandling forekommer. I mange tilfeller har man derfor valgt og observere denne pasientgruppen aktivt. Radikal kirurgi og strålebehandling har kun blitt gitt i tilfeller med manifeste carcinomer.⁷ Identifikasjon av bedre prognostiske markører vil forhåpentligvis muliggjøre en seleksjon av høyrisikopasienter slik at disse får en tettere oppfølging og mer intensiv behandling. Et av de mest lovende prognostiske system ser ut til å være det såkalte "invasjonsfrontsystemet".⁸

Systemet bygger på en hypotese om at overgangssonen mellom tumor og det underliggende bindevev (invasjonsfronten) inneholder den beste prognostiske informasjon. En rekke molekylærbiologiske studier underbygger dette nye prognostiske systemet, siden helt sentrale molekylære interaksjoner for kreftcellespredning skjer i overgangssonen mellom kreftsvulsten og vertsvevet.

MMP (matrix metalloproteinaser) er Zn-avhengige endopeptidaser. Genfamilien består av 23 ulike medlemmer, og klassifiseres i fem grupper basert på struktur og substratspesifisitet: Kollagenaser, Gelatinaser (MMP-2), Stromelysiner, Membrantype MMP og andre.⁹ Hvert enkelt MMP er bygd opp av et propeptid og et katalytisk domene (proteasedomenet). Sistnevnte består av et konservert methionin hvor de tre histidinenene danner kompleks med et katalytisk Zn-atom. Propeptidet er matrix metalloproteinasens regulatoriske del, og er ansvarlig for at proteasen forblir i latent (zymogen) form.

MMP er sterkt delaktige i en rekke biologiske funksjoner som f.eks remodellering av vev under embryonal utvikling, sårtilheling og invasjon av celler over basalmembranen.

De fleste celler syntetiserer MMP for deretter og seernere det ut i ECM. Inflammatoriske celler, derimot, lagrer MMP. Distribusjonen av MMP i ulike vev varierer sterkt. Mens noen syntetiseres konstitutivt av mange celler, for eksempel MMP-2, vil andre syntetiseres kun ved stimulering.¹⁰

I metastaseprosessen, som består av multiple trinn, er degradering av omkringliggende bindevev og spesielt basalmembranen et initielt step. MMP bryter ned ulike komponenter i den ekstracellulære matrix (ECM), og de ulike matrix metallo- proteinasene har en unik substratspesifisitet. Det er rapportert at MMP-2 og MMP-9 kan bryte ned type IV kollagen, som er en av hovedkomponentene i basalmembranen. Tidligere eksperimentelle og biokjemiske studier av matrix metalloproteinaser har indikert at MMP-2 kan være av betydning i den invasive front. Dårlig utfall (død) ved oral cancer er ofte

et resultat av lokalt residiv og/eller metastaser. Faktorer som representerer en potensiell invasjon eller metastasering, slik som muligens uttrykkelse av MMP-2, vil dermed kunne være med og forutsi prognosen ved OSC. MMP-2 secernerer i en inaktiv form (pro-MMP-2) og konverteres til en aktiv form (aktiv MMP-2) ved hjelp av membran type 1-metalloproteinase (MT1-MMP). TIMP-2 (Tissue-inhibitor of metalloproteinase 2) trodde man opprinnelig var en inhibitor av proteasen, og dermed en negativ faktor ved tumor invasjon. Imidlertid har en nylig publisert biokjemisk analyse vist at TIMP-2 muligens bidrar til det motsatte, nemlig å aktivere MMP-2.¹¹

Formålet med studien var å evaluere forekomsten av MMP-2 i OSCC og den prognostiske verdien av MMP-2.

PASIENTER OG METODER

Pasient karakteristikka

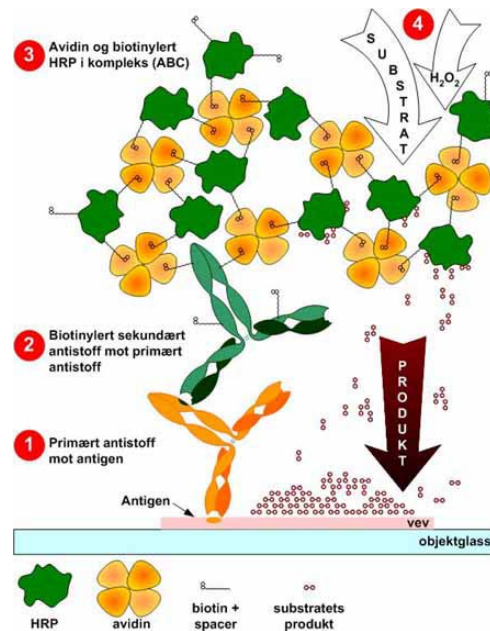
I studien inngikk preparater fra 61 pasienter med diagnosen intraoralt plateepitelcarcinom (OSC) lokalisert til tunge, munngulv, gingiva eller kinnslimhinne. Samtlige pasienter tilhørte TNM klassifikasjonsgruppe 1 eller 2, og er behandlet ved Rikshospitalet i perioden 1993-2002. Det kliniske forløpet er kjent. Gjennomsnittsalder ved diagnosetidspunktet var 64,3 år \approx 64 år (Range 39 – 86 år), og av 61 pasienter var 26 menn og 35 kvinner. Gjennomsnittlig overlevelsestid (tatt utg.punkt i diagnosetidspunkt) var 35,7 mnd.

Vevspreparasjon

Biopsiene ble fiksert med 10 % formalin, støpt inn i en parafinblokk og deretter skåret i 4 μ m tykkelse ved hjelp av en mikrotom.

Immunohistokjemisk analyse

Immunhistokjemi ble utført på de parafininnstøpte 4 μ m tykke snittene. Avidin Biotin Complex (ABC) metoden ble benyttet etter å ha innledningsvis quenched snittene for å blokkere uønsket endogen peroksydaseaktivitet.¹²



Etter deparafinering, hydrering og quenching av snittene utføres følgende prosedyrer:

1. Blokkering med normalserum: Hest normalserum i 20 min. Bankes av før man forsiktig tørker rundt snittene. Normalserumet skal stamme fra det samme dyret som det sekundære antistoffet er produsert i, og benyttes for å redusere/blokkere den uspesifikke bindingen av sekundærantistoff til Fc-reseptorer i vevet.
2. Primært antistoff: MMP-2 ab 0589. Inkuberes i kjøleskap over natten.
3. Snittene vaskes i PBS 2x5 min.
4. Sekundært biotinyllert antistoff: Hest α Mus i 30 min.
5. Snittene vaskes i PBS 2x5min.
6. ABC (HRP) i 60 min.
7. Snittene vaskes i PBS 2x5 min
8. Substrat dryppes på snittene: DAB (diaminobenzidine tetrahydroklorid) i 7 min.
9. Vaskes i vann
10. Kontrastfarging med Hematoxilin

Det ble benyttet primært antistoff mot MMP-2 (MMP-2 ab 0589) i 1:100 fortynning. Dette antistoffet gjenkjenner både den latente (zymogen) formen og den aktive formen av MMP-2.

Scoring av immunohistokjemisk farging:

Vi delte analysen inn i tre hovedgrupper. Den ene tok for seg tumoren i sin helhet og nærliggende epitel, mens de to andre gruppene tok for seg henholdsvis endotel og fibroblaster i tilknytning til normalepitel og tumor.

Variabler med henblikk på tumor:

1. Normalepitel
2. Overgangsepitel
3. Hele tumor
4. Tumorfront alene (5-10 cellelag)
5. Tumorovertflate
6. Tumor basalfront alene (1-2 cellelag)

Følgende gradering av variablene ble benyttet: 0 = negativ dvs. ingen farging, 1 = positiv dvs. synlig farging.

Variabler med henblikk på endotel:

1. Endotel under normalepitel
2. Endotel under tumorfront

Følgende gradering av variablene ble benyttet: 0 = 0-1 % farget endotel, 1 = 1-10 % farget endotel, 2 = 10-50 % farget endotel, 3 = > 50 % farget endotel.

Variabler med henblikk på fibroblaster:

1. Fibroblaster under normalepitel
2. Fibroblaster under tumorfront

Følgende gradering av variablene ble benyttet: 0 = ingen fibroblaster, 1 = noen fibroblaster, 2 = mange fibroblaster.

Statistisk analyse

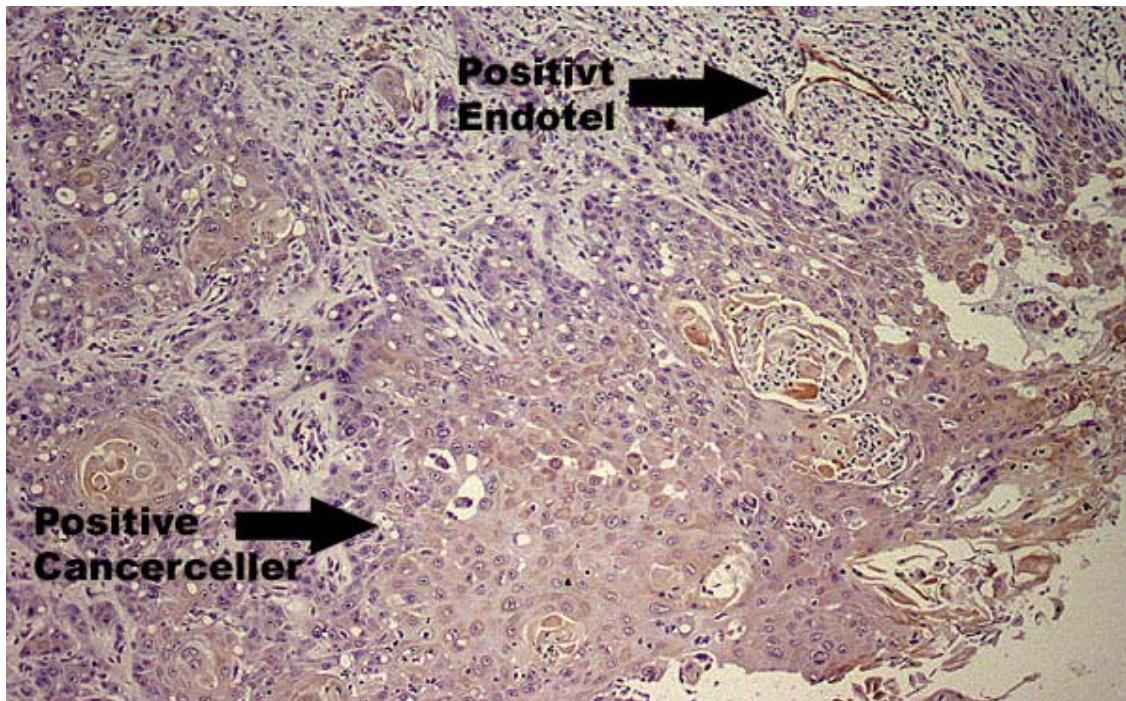
En overlevelsesanalyse ble utført ved hjelp av Kaplan Meier metoden. For sammenlikning av overlevelse mellom de ulike graderingene av hver enkelt variabel ble det brukt logrank test. En p-verdi på $< 0,05$ ble vurdert som statistisk signifikant.

RESULTATER

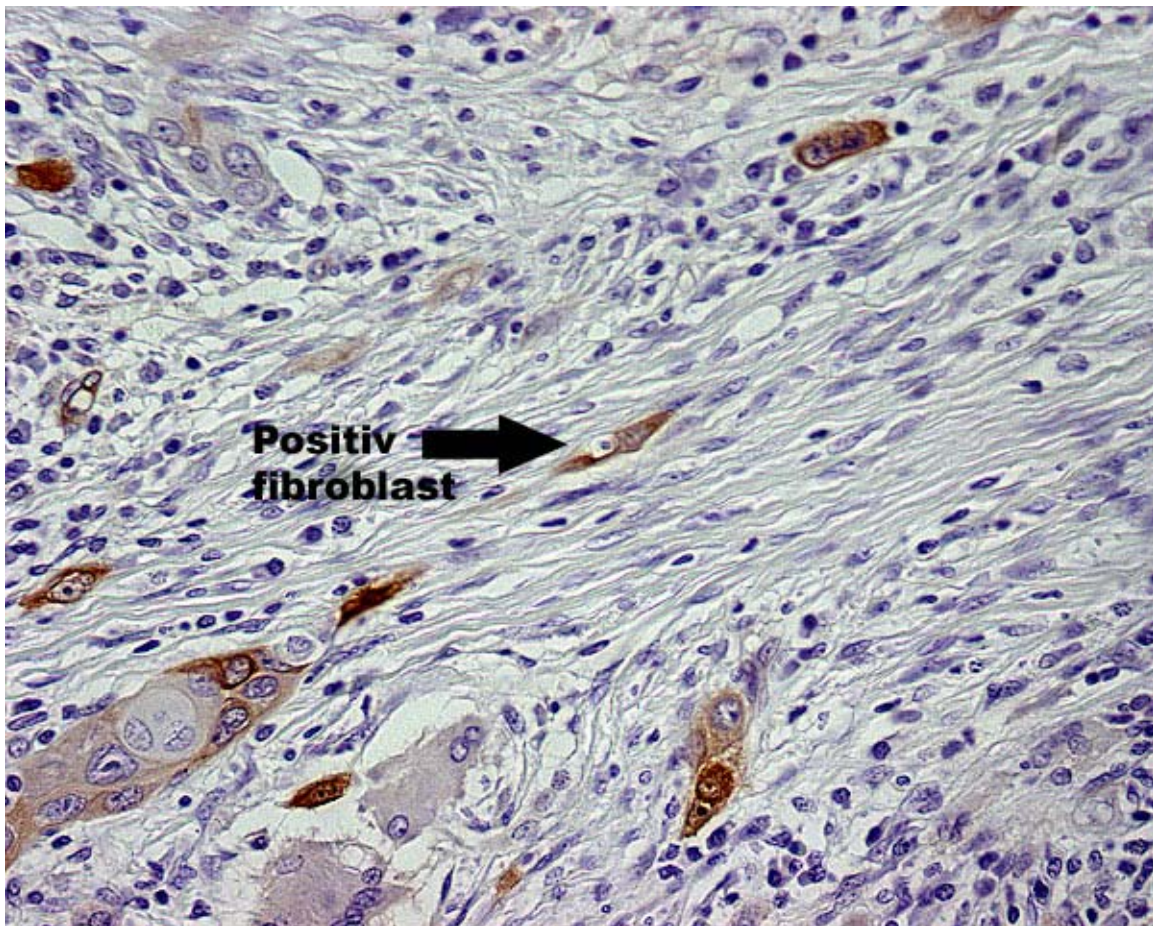
Immunohistokjemisk analyse

Uttrykkelsen av MMP-2 ble undersøkt v.h.a immunohistokjemisk farging av vevsbiter tatt fra gingiva, tunge, munngulv og kinnslimhinne. Positive funn av MMP-2 viste seg på snittene som en brunlig farge (bilde 1, 2)

Bilde 1 Positive cancerceller og positivt endotel



Bilde 2 Positive fibroblaster, endotelceller og tumorceller i bindevev nær tumorfront



61 kasus ble undersøkt i mikroskop med hensyn på følgende celler og områder:

1) Tumor i sin helhet

34 kasus ble klassifisert som MMP-2 positive.

2) Tumor overflate

32 kasus ble klassifisert som MMP-2 positive.

3) Tumorfront (5-10 cellelag)

30 kasus ble klassifisert som MMP-2 positive.

4) Tumor basalfrent (1-2 cellelag)

9 kasus ble klassifisert som MMP-2 positive.

5) Normalt epitel i et vilkårlig område i snittet
Ingen positive funn.

6) Overgangsepitel

13 kasus (av et utvalg på 51, noen snitt var ikke mulige å score) ble klassifisert som MMP-2 positive.

Endotelcellene ble scoret med et annet system enn tumorcellene: 0 = 0-1 % positivt endotel, 1 = 1-10 % positivt endotel, 2 = 10-50 % positivt endotel, 3 = > 50 % positivt endotel.

7) Endotelceller under tumorfront

5 kasus fikk score = 0, 2 kasus fikk score = 1, 17 kasus fikk score = 2, 35 kasus fikk score = 3. 2 snitt var ikke mulig å score adekvat.

8) Endotelceller under normalt epitel

24 kasus fikk score = 0, 4 kasus fikk score = 1, 12 kasus fikk score = 2, 1 kasus fikk score = 3. 20 snitt var ikke mulig å score adekvat.

I tillegg til tumorceller, normalepitel og endotel ble også antall MMP-2 positive fibroblaster scoret med et eget system: 0 = ingen positive fibroblaster, 1 = noen positive fibroblaster, 2 = mange positive fibroblaster.

9) *Fibroblaster under tumorfront*

18 kasus fikk score = 0, 25 kasus fikk score = 1, 16 kasus fikk score = 2. 2 snitt var ikke mulig å score adekvat.

10) *Fibroblaster under normalt epitel*

35 kasus fikk score = 0, 4 kasus fikk score = 1, 2 kasus fikk score = 2. 20 snitt var ikke mulig å score adekvat.

Det ble gjort positive funn av MMP-2 hovedsakelig på tumorceller. De var lokalisert

enten til celleoverflaten eller cellenes cytoplasma. Det ble også gjort positive MMP-2 funn på endotelceller og fibroblaster i områdene rundt tumorcellene.

Forholdet mellom de kliniske faktorer og uttrykkelsen av MMP-2 ble evaluert v.h.a en Pearson Chi-kvadrat test.(tabell I, II og III). p -verdier under 0,05 ble vurdert som statistisk signifikant.

Tabell I Forholdet mellom kliniske faktorer og uttrykkelse av MMP-2 i tumor

	Totalt antall	MMP-2 (+)	MMP-2(+)	p Pearson Chi-Square
		Antall	%	
Alder				
<60	25	13	52,0	0,624
>60	36	21	58,3	
Kjønn				
Kvinne	35	18	51,4	0,432
Mann	26	16	61,5	
TNM				
0	0	0	0	
1	29	16	55,2	0,933
2	32	18	56,3	
3	0	0	0	
Lokalisasjon				
1=gingiva	3	1	33,3	
2=tunge	27	15	55,6	0,708
3=munngulv	27	16	59,3	
4=kinnslimh.	1	0	0	
Status				
0= Er i live uten sykdom eller død annen sykdom	33	16	48,5	0,471
1= Residiv eller død av sykdom	20	11	55,0	
Overlevelse i mnd				
<60 (5 år)	52	28	53,9	0,410
>60 (5 år)	9	6	66,7	

Tabell II Forholdet mellom kliniske faktorer og uttrykkelse av MMP-2 i tumors basale front

	Totalt antall	MMP-2 (+)	MMP-2(+)	P Pearson Chi- Square
		Antall	%	
Alder				
<60	24	4	16,7	0,819
>60	37	5	13,5	
Kjønn				
Kvinne	26	4	15,4	0,905
Mann	35	5	14,3	
TNM				
0	0	0	0	0,099
1	29	2	6,9	
2	32	7	5,4	
3	0	0	0	
Lokalisasjon				
1 = gingiva	3	1	33,3	0,146
2 = tunge	27	7	25,9	
3 = munngulv	27	1	3,7	
4 = kinnslimh.	1	0	0	
Status				
0 = Er i live uten sykdom el. død av annen sykd.	33	3	9,1	0,176
1 = Residiv el. død av sykdom	28	6	21,4	
Overlevelse i mnd				
<60 (5 år)	52	4	7,7	0,176
>60 (5 år)	9	5	55,6	

Tabell III Forholdet mellom kliniske faktorer og uttrykkelse av MMP-2 i fibroblaster nær tumorfront

		Totalt antall	MMP-2 (+)	MMP-2(+)	p Pearson Chi-Square
			Antall	%	
Alder, gruppe*					
<60	0	25	8	32,0	0,950
	1		10	40,0	
	2		7	28,0	
>60	0	34	10	29,4	
	1		15	44,1	
	2		9	26,5	
Kjønn, gruppe*					
Kvinne	0	26	8	30,8	0,999
	1		11	42,3	
	2		7	26,9	
Mann	0	33	10	30,3	
	1		14	42,4	
	2		9	27,3	
TNM, gruppe*					
0		0	0	0	
1	0	28	8	28,6	0,835
	1		13	46,4	
	2		7	25,0	
2	0	31	10	32,3	
	1		12	38,7	
	2		9	29,0	
3		0	0	0	
Lokalisasjon, gruppe*					
1=gingiva	0	3	1	33,3	
	1		1	33,3	
	2		1	33,3	
2=tunge	0	27	10	37,0	0,512
	1		12	44,4	
	2		5	18,5	
3=munngulv	0	25	5		
	1		10		
	2		10		
4=kinnslimh.	0	1	0		
	1		1		
	2		0		
Status					
0 = Er i live uten sykdom el. død av annen sykdom	0	32	8	25,0	0,145
	1		12	37,5	
	2		12	37,5	
1= Residiv el. død av	0	27	10	37,0	
	1		13	48,2	

sykdom	2		4	14,8	
Overlevelse i mnd					
<60 (5 år)	0	51	17	33,3	0,477
	1		21	41,2	
	2		13	25,5	
>60 (5 år)	0	8	1	12,5	
	1		4	50,0	
	2		3	37,5	

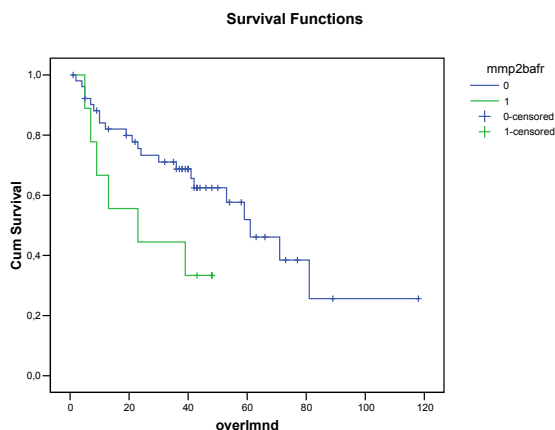
* 0 = ingen fibroblaster, 1 = noen fibroblaster, 2= mange fibroblaster

Uttrykkelse av MMP-2 viser ingen signifikant korrelasjon verken med pasientens kjønn, alder, lokalisasjon, status, overlevelse eller TNM-gradering.

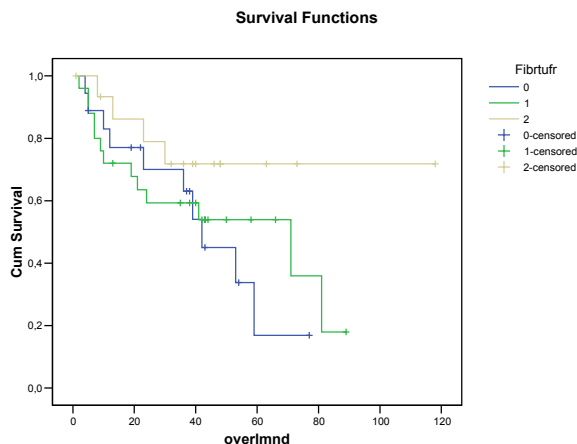
En overlevelsesanalyse ble også utført ved hjelp av Kaplan Meier metoden. (tabell IV og V)

Tabell V Sammenheng mellom uttrykkelse av MMP-2 positive fibroblaster i tilknytning til tumors front og grad av overlevelse. 0 = ingen fibroblaster, 1 = noen fibroblaster, 2 = mange fibroblaster. p -verdien = 0,2379

DISKUSJON



Tabell IV Sammenheng mellom uttrykkelse av MMP-2 i tumors basale front og grad av overlevelse. 0 = negative MMP-2 funn, 1 = positive MMP-2 funn. p -verdi = 0,0661



Mye tyder på at tumorens invasive frontzone er det viktigste området når det gjelder utredning av prognose. I følge Bryne et al. vil de molekylære og morfologiske forandringene i overgangen mellom vertens normale vev og tumor, den invasive front, reflektere tumorprognosen bedre enn sentrale og superfisielle deler av tumor. Økt proliferasjon, redusert apoptose, lavere grad av differensiering og tap av celle-celle adhesjoner er alle generelle trekk ved maligne tumores. I tillegg foreligger det en rekke interaksjoner mellom verten og cancercellene i den invasive front som ansees som essensielle for spredning av tumor.¹³

MMP-2 er et av de proteinene som sannsynligvis spiller en betydelig rolle ved tumorinvasjon og metastasering. I metastaseprosessen, som består av multiple trinn, er degradering av omkringliggende bindevev og basalmembran et initielt step. MMP bryter ned ulike komponenter i den extracellulære matrix (ECM), og de ulike matrix metallo- proteinasene har alle en unik substratspesifisitet. Det er rapportert at MMP-2 og MMP-9 kan bryte ned type IV kollagen som er en av hovedkomponentene i basalmembranen.

Resultatene i denne studien bekrefter langt på vei Brynes hypotese. Den basale (invasive) frontzone viste seg å være ulik de øvrige deler av tumor med hensyn på uttrykkelse av MMP-2 og prognose/overlevelseshastighet hos pasientene. Overlevelseshastigheten, utført v.h.a Kaplan Meier metoden, viser en høyere grad av overlevelse

blant pasienter med negative MMP-2 funn i den basale frontsonen (Def. 1-2 cellelag). P-verdien, 0,0661, ligger tett opp til det som vurderes som statistisk signifikant. Vi mener det er sannsynlig at denne verdien ville blitt signifikant dersom pasientmaterialet hadde vært større.

MMP, inkludert MMP-2, MMP-9 og Stromelysin, secernerer ikke systematisk av tumorcellene selv, men av non-maligne celler i det peritumorale vevsvevet. Flere *in situ* hybridiseringsstudier har vist at MMP-2 mRNA hovedsakelig finnes i stromale celler (bindevevsceller) og ikke i cancerceller. Derimot finner man aktivt MMP-2 på cancercellenes overflate. Fibroblaster inducerer uttrykkelsen av MT1-MMP på overflaten av cancercellene, og øker cancercellenes evne til å binde exogent latent MMP-2 som de i sin tur aktiverer.^{14, 15, 16} Disse funnene støtter en hypotese om at et samspill mellom tumorceller i den basale frontsonen og celler i det nærliggende bindevev er nødvendig ved spredning av tumor. Våre resultater synes interessante i denne sammenheng. Vi fant MMP-2 positivitet både i den basale frontsonen og i fibroblaster lokalisert nært opp til tumors invasive front. Antallet MMP-2 positive celler var større nær tumor enn i god avstand fra denne. Dette støtter hypotesen om at MMP-2 har en viktig rolle ved tumorprogresjon. MMP-2 kan deles inn i to former, en latent form og en aktiv form. Antistoffet som ble benyttet i denne studien var ikke spesifikt for en av formene, og vi kan derfor ikke si noe om hvorvidt latent MMP-2 var lokalisert til fibroblastene og aktiv MMP-2 var lokalisert til tumorcellene.

Et av hovedproblemene i de fleste histopatologiske graderingssystemer er graden av ulikhet mellom observatørene. En diagnostisk metode bør ikke benyttes hvis den ikke er reproducerbar på et akseptabelt nivå. I denne studien har to studenter og to vitenskapelig ansatte gradert snittene uavhengig av hverandre. Resultatene ble sjekket opp mot hverandre i etterkant og var akseptabelt sammenfallende. En forbedring av reproducerbarheten ved hjelp av en computer der man f.eks registrerer antall positive og negative celler på et visst areal eller registrerer fargeintensitet.

På grunnlag av våre funn og funn gjort i tidligere studier tror vi at MMP-2 kan være en viktig prognostisk markør, og derfor av terapeutisk verdi. Flere undersøkelser kreves for å verifisere

funnene før de eventuelt kan komme til klinisk anvendelse.

KONKLUSJON

Positive funn av MMP-2 ble gjort hovedsakelig på tumorceller, lokalisert til cellenes overflate eller cytoplasma. Den basale frontsonen ser ut til å være av størst betydning når det gjelder prognose og overlevelsesrate. I normalt epitel var det ingen MMP-2 positivitet, og MMP-2 er derfor trolig en nyttig markør for å kartlegge cancerinvolvert vev. MMP-2 positive fibroblaster ble registrert i tilknytning til den basale frontsonen, noe som kan tyde på et samspill mellom det stromale vev og tumorvevet.

REFERANSER

1. Cancer in Norway 1996, Oslo: The cancer Registry of Norway. Institute for epidemiological cancer of research, 2000
2. Sudbø J, Warloe T, Aamdal S, Reith A, Bryne M. Detection and treatment of high-risk oral precancerous lesions. Tidsskr Nor Lægefor 2001; 121: 3066-71
3. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. Cancer 1975; 36: 1386-92
4. Gupta PC. Leukoplakia and incidence of oral cancer. J Oral Pathol Med 1989; 18: 17
5. Mashberg A, Garfinkel L. Early diagnosis of oral cancer: the erythroplastic lesion in high risk sites. CA Cancer J Clin 1978; 28: 297-303
6. Mashberg A. Erythroplasia: the earliest sign of asymptomatic oral cancer. J Am Dent Assoc 1978; 96: 615-20
7. Sudbø J, Warloe T, Aamdal S, Reith A, Bryne M. Detection and treatment of high-risk oral precancerous lesions. Tidsskr Nor Lægefor 2001; 121: 3066-71
8. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Diseases 1998, nr. 4: 70-77
9. Malay Mandal, Amritlal Mandal, Sudip Das, Tapati Chakraborti, Sajal Chakraborti. Clinical implications of matrix metalloproteinases. Molecular and Cellular Biochemistry 252: 305-329
10. Malay Mandal, Amritlal Mandal, Sudip Das, Tapati Chakraborti, Sajal Chakraborti. Clinical implications of matrix metalloproteinases. Molecular and Cellular Biochemistry 252: 305-329
11. Tomokazu Yoshiaki, Yumiko Marnyarna, Hiroshi Sato, Mitsuri Furukawa. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. Int. J. Cancer: 95, 44-50 (2001)
12. Schreurs O. Materialer og metoder, immunhistokjemi.
www.iob.uio.no/forskning/forskningsgrupper/cellimpat/teknikk/IH.html#ABC
13. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? Oral Diseases 1998, nr. 4: 70-77
14. Tomokazu Yoshiaki, Yumiko Marnyarna, Hiroshi Sato, Mitsuri Furukawa. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 correlates with activation of matrix metalloproteinase-2 and predicts poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. Int. J. Cancer: 95, 44-50 (2001)
15. Yasutaka Hayashido, Kazuhiko Urabe, Yukio Yoshioka, Hisataka Kitano, Tetsuji Okamoto, Tokuzo Matsuya. Participation of fibroblasts in MMP-2 binding and activation on the surface of oral squamous carcinoma cells. International Journal of Oncology 22: 657-662, 2003.
16. Shiomi T, Okada Y. MT1-MMP and MMP-7 in invasion and metastasis of human cancers. Cancer and Metastasis Reviews 2003, nr. 22: 145-152